

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 01-104192

(43)Date of publication of application : 21.04.1989

(51)Int.Cl. C12P 21/02

(21)Application number : 63-194708

(71)Applicant : W R GRACE & CO

(22)Date of filing : 05.08.1988

(72)Inventor : LOVINGER GERALD GEORGE
GROSS AKIVA TUVIA
FORTNEY DONALD ZANE

(30)Priority

Priority number : 87 83741 Priority date : 07.08.1987 Priority country : US

(54) METHOD FOR BONDING VIBRIOLYSIN

(57)Abstract:

PURPOSE: To produce a dipeptide or a polypeptide by reacting an acid component of an amino acid, a peptide having an N-terminal protecting group or their salt with vibriolysin participating in the formation of peptide bond.

CONSTITUTION: A dipeptide or a polypeptide is produced by reacting an acid component of an amino acid, a peptide having an N-terminal protecting group or their salt with an amine component of an amino acid, a peptide having an N-terminal protecting group or their salt in the presence of vibriolysin participating in the formation of peptide bond. The process is carried out by suspending a water-containing immobilized enzyme in a water-miscible organic solvent containing both starting raw materials and proceeding the reaction under stirring. The reaction is preferably carried out at 20-25° C for 2-24hr.

LEGAL STATUS

[Date of request for examination]

[Date of sending the examiner's decision of rejection]

[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number]

[Date of registration]

[Number of appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of requesting appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of extinction of right]

Copyright (C); 1998,2003 Japan Patent Office

⑨ 日本国特許庁(JP)

⑩ 特許出願公開

⑫ 公開特許公報(A)

平1-104192

⑥ Int. Cl.⁴

識別記号

庁内整理番号

⑬ 公開 平成1年(1989)4月21日

C 12 P 21/02

B-6712-4B

審査請求 未請求 請求項の数 1 (全10頁)

⑭ 発明の名称 ビブリオリシン結合方法

⑮ 特 願 昭63-194708

⑯ 出 願 昭63(1988)8月5日

優先権主張 ⑰ 1987年8月7日 ⑱ 米国(US) ⑲ 083741

⑳ 発 明 者 ジェラルド・ジョー アメリカ合衆国メリーランド州20879ゲイザーズバーグ・
ジ・ラビンジャー ウォーカーズチヨイズロード 18606

㉑ 発 明 者 アキバ・トウビア・グ アメリカ合衆国メリーランド州20850ロックビル・マコー
ロス ミックロード 2441

㉒ 出 願 人 ダブリュー・アール・ アメリカ合衆国ニューヨーク州10036ニューヨーク・アベ
グレイス・アンド・カ ニューオブザアメリカズ 1114
ンパニー・コネチカッ
ト

㉓ 代 理 人 弁理士 小田島 平吉
最終頁に続く

明 細 書

1. 【発明の名称】

ビブリオリシン結合方法

2. 【特許請求の範囲】

1. アミノ酸もしくはN-末端保護基を有するペプチドまたはそれらの塩の酸成分を、ペプチド結合の生成に介在するビブリオリシンの存在下で、アミノ酸もしくはN-末端保護基を有するペプチドまたはそれらの塩のアミン成分と反応させることによる、ジペプチドまたはポリペプチドの製造方法。

3. 【発明の詳細な説明】

本発明は、1986年12月22日にアキヴァ・T・グロス(Akiva T. Gross)により出願された「酵素介在結合反応」という標題で現在出願中の米国特許出願番号944,027の一部継続出願である。

ジペプチド類の酵素介在合成法はよく知られている。すなわち米国特許4,165,311、4,436,925および4,256,836は、不

溶性付加化合物類、例えば1モルのフェニルアラニンメチルエステルと1モルのN-保護されたアスパルチル-フェニルアラニンメチルエステルとの付加化合物、を製造するための水性媒体中での合成法を記している。米国特許4,284,721は、N-保護されたアスパルチン酸とフェニルアラニン低級アルキルエステル類とが、水-混和性共溶媒を含有していてもよい水-非混和性溶媒の存在下で、酵素により結合できるということを教示しているが、その際に水-混和性溶媒の量は酵素の不活性化または抑制を防ぐため制限されなければならない。米国特許4,116,768および4,119,493は、水性媒体中での共溶媒としての水-混和性溶媒の使用に関する同様な教示を含んでいる。同様に、アンゲヴァンドテ・ヘミ・インターナショナル・エディッション・イン・イングリッシュ(Angew. Chem. Int. Ed. Engl.)、24(1985)、2号、87頁には、水-混和性溶媒を共溶媒として水と混合して使用できるがプロテアーゼ酵素の触媒活性は共溶媒の濃度が増

加するにつれて減少することおよびキモトリプシンを酵素として使用する場合には50%以上では合成が生じないことが示されている。考えられる例外として、ポリオール（例えば1,4-ブタンジオール）を使用すると、ある場合には酵素を安定化させるかもしれない。N-ホルミルジペプチド類（例えばN-ホルミルアスパルターメ）およびポリペプチド類を製造するための酵素結合のために水性または水性-有機媒体を使用することも、WO 8604942およびヨーロッパ特許公報0149594中に記されている。

種々の科学雑誌に掲載されている多数の文献にも、水および水-混和性有機溶媒と組み合わせた酵素の使用が論じられており、そして溶媒、水の量、酵素および基質の選択により変動すると思われる収率が得られている。また、酵素が固定されているかどうかのも一つの要素でもあるようだ。50/50のアセトニトリル/水溶媒系の使用は、ニルソン(Nilsson)およびモสบアハ(Mosbach)によりバイオテクノロジー・アンド・バイオエン

89(1985)中に記されている。コネッケ(Konnecke)他はモンテシュリフツ・フュル・ヘミイ(Monatshefte für Chemie)、112、469-481(1981)、475頁中で、溶媒としてのアセトニトリルの使用に言及している。他の興味ある文献は、ザ・ジャーナル・オブ・バイオケミストリー(J. Biochem.)、89、385(1981)；ザ・ジャーナル・オブ・ザ・オーガニック・ケミストリー(J. Org. Chem.)、51、2728(1986)；コレクション・オブ・チェコスロヴァック・ケミカル・コミュニケーション(Coll. Czechos. Chem. Comm.)、49、231(1984)；およびプロシーディングス・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンス(Proc. Natl. Acad. Sci.)、80、3241(1983)である。

文献では、一般的には酵素、そして特にプロテアーゼ、が水-混和性および水-非混和性有機溶媒類の両者中で使用されると示されているが、水-混和性溶媒の方が幾分劣っているような一般的

ジニアリング(Biotech Bioeng.)、26、1146(1984)中に記されている。この文献には、ブタンジオール/水(90/10)の使用も記されている。溶媒としてのアセトニトリルの使用はJ.B.ジョーンズ(Jones)およびJ.F.ベック(Beck)の「有機化学における生化学系の適用(Applications of Biochemical Systems in Organic Chemistry)、1部、(J.B.ジョーンズ、C.J.シー(Sih.)およびD.ペールマン(Perlmán)編集)、107頁(1. ニューヨーク、J.ウィリー、1976；並びにJ.B.ジョーンズおよびM.M.メヘス(Mehes)、カナディアン・ジャーナル・オブ・ケミストリー(Can. J. Chem.)、57、2245(1979)中で論じられている。水-非混和性/水混和性溶媒類の混合物中でのL-フェニルアラニンメチルエステル(すなわちL-phenylalanine methyl ester)およびN-保護されたN-カルボベンジルオキシ-アスパルチン酸(すなわちZ-aspartic acid)との結合はバイオテクノロジー・レターズ(Biotech. Lett.)、7、7

な概念があるようだ。すなわち、「ほとんどの酵素類は親水性の水-混和性有機溶媒中では不活性であり、このことは酵素からそれらの溶媒中への必要水の分配により容易に理解される」と述べられている(A.M.クリバノフ(Klibanov)、ケムテック(Chemtech)、354頁、1986年6月)。

本発明は、水-混和性有機溶媒中でのプロテアーゼの使用に基づいている。

本発明は、N-置換されたアスパルチン酸およびフェニルアラニン低級アルキルエステルからなる群から選択された2種の基質の間のペプチド結合生成に対して触媒作用を与えるためメタロエンドプロテアーゼ酵素を使用する方法である。該エステルのベンジル系炭素原子は、1個以上の水素と容易に置換可能な不安定な基で、置換されていてもよい。高いpH水準における酵素の製造は、プロテアーゼの活性を改良し、そして競合するエステラーゼ活性を相当減退させる。本発明の方法には、上記の方法を水-混和性有機溶媒の存在下で実施するやり方も包括される。

水-混和性溶媒の使用は多くの利点を与える。予期に反して、酵素に必要な水を枯渇させることなくこれらの溶媒類を使用することができる。例えば選定的方法を実施する場合には、酵素活性用に必要な水の量は溶媒系の2-10重量%にあたる水を保持することにより供給でき、残りは水-混和性溶媒またはそれと他の溶媒との混合物である。閉鎖系(例えば選定的反応とは対照的な本質的にはパッチ反応)では、酵素およびその基質が上記の2-10重量%を供給するのに十分な水を放出するであろう。しかしながら、酵素を充分大量の本質的には無水の水-混和性溶媒と接触させる場合には、溶媒中の水の量を約2%以下に下げそして酵素を変性させるのに十分な水が抽出されることを理解すべきである。10%以上の、例えば50%程度の、水の量も使用できるが、そうすると水-混和性溶媒を使用する際の利点が減じられるかもしれない。

多くの反応では、水-混和性溶媒を単独溶媒としてまたは共溶媒として使用すると一相の液体相

酵素が水の抽出または他の手段により変性に対して抵抗性であることを意味する。「溶媒系」という語は液体相の溶媒部分を示すために使用され、そして水-混和性溶媒およびそれと共に使用される共溶媒、例えば水もしくは水-混和性溶媒、を包含している。

「水-混和性有機溶媒」という語は、水といずれの割合でも混和可能であり一相系を形成できる有機液体を意味する。適当な有機溶媒の例には、アルコール類(例えばエタノール、1-プロパノールおよび2-プロパノール);ポリオール類(例えば1,4-ブタンジオールおよびジエチレングリコール);ニトリル類(例えばアセトニトリル);およびエーテル類(例えばジオキサンおよびテトラヒドロフラン);並びに他の溶媒、例えばジメチルホルムアミド、ジメチルスルホキシドおよびアセトン、が包含される。

アセトニトリルが好適な水-混和性溶媒である。本発明の別の態様は、アセトニトリルを種々のアミノ酸類および酵素類と共に使用して酵素介在結

を与えることができ、それにより溶媒が水と非混和性である場合に生じる相移動に関する制限が避けられる。例えば、水-混和性溶媒を使用すると、しばしば反応速度が遅まる。また、多くの有用な水-混和性有機溶媒の比誘電率は5-60(好適には30-60)であり、そのことは1相の液相生成に寄与しており、なぜならばほとんどのアミノ酸誘導体が比較的有極性でありしかも該溶媒中に可溶性であるからである。例えば、フェニルアラニンのメチルエステルはヘキサンまたは酢酸エチル中よりアセトニトリル中の方にはるかに可溶性である。

水-混和性溶媒の使用は、反応平衡を移行させる。例えば、酢酸エチル中ではN-ホルミルアスパルチン酸とフェニルアラニンメチルエステルとの反応は約10%の収率を与えるが、アセトニトリル中では約80%の収率を与える。

固定されていてもまたは「遊離」形であっても、酵素は水-非混和性溶媒とはちがひ水-混和性溶媒中ではるかに安定である。「安定性」とは、

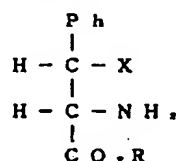
合反応によりジペプチド類およびポリペプチド類を製造できる方法である。この反応で使用するのに適しているアミノ酸類の例には下記のものを含むされる:脂肪族アミノ酸類、例えばモノアミノモノカルボン酸類、例えばグリシン(Gly)、アラニン(Ala)、バリン(Val)、ノルバリン(nor-Val)、ロイシン(Leu)、イソロイシン(iso-Leu)、ノルロイシン(nor-Leu);オキシアミノ酸類、例えばセリン(Ser)、スレオニン(Thr)、ホモセリン(homo-Ser);硫黄-含有アミノ酸類、例えばメチオニン(Met)またはシステイン(Cys-S)およびシステイン(Cys-H);モノアミノジカルボン酸類、例えばアスパルチン酸(Asp)およびグルタミン酸(Glu);ジアミノモノカルボン酸類、例えばオルニチン(Orn)、リシン(Lys)、アルギニン(Arg);芳香族アミノ酸類、例えばフェニルアラニン(Phe)、チロシン(Tyr)、並びに複素環式アミノ酸類、例えばヒスチジン(Hi

s)、トリプトファン(Trp)。(アミノ酸は当分野で普通に使用されている記号により示される。)

溶媒の選択においては注意を払わなければならない。例えば、酵素が金属を含有している場合には、溶媒は金属と錯体形成するものであってはならない。DMFおよびDMSOはメタロプロテインゼ中の金属成分と錯体形成するようであり、従ってそれらは好ましくは溶媒系の50%(モル基準で)以下に制限すべきであり、残りは水または他の溶媒であることができる。溶媒は、それが酵素または基質と化学的に反応しないという意味で、不活性でなければならない。例えば、アセトンが溶媒である場合には、基質または酵素のアミン基との反応を最少にするような条件下でそれを使用すべきである。

アシル供与体として作用するアミノ酸類は一般的にN位置に保護基を有している。適当なN-保護基の例は、ペプチド合成で通常使用されているもの、例えばターシャリーアルコキシカルボニ

容易に置換可能な基で置換されている誘導体類、を使用できる。適当に置換されたフェニルアラニン誘導体類の例には、式



[式中、

Phはフェニル(置換されているかまたは未置換)であり、

Xは-OH、-SH、-Cl、-Br、-I、-OCOCH₃、-OCOCH₃、-NH₂、

または-SCH₃であり、そして

Rは炭素数が1~4の低級アルキル基である]に相当するものが含まれる。

アミノを供与するアミノ酸は適当なC-末端保護基により保護されている。アミン成分のカルボキシル基用の保護基(C-末端保護基)には、アルコキシ基、例えばメトキシ(-OMe)、エトキシ(-OEt);ターシャリーアルコキシ基、

ル基、例えばt-ブチルオキシカルボニル(BOC-)、t-アミルオキシカルボニル(t-Aoc);不活性置換基で置換されていてもよいベンジルオキシカルボニル基、例えばベンジルオキシカルボニル(Z-)、p-メトキシベンジルオキシカルボニル(PMZ-)、3,5-ジメトキシベンジルオキシカルボニル(Z(OMe)₂-)、2,4,6-トリメチルベンジルオキシカルボニル(TMZ-)、p-フェニルアゾベンジルオキシカルボニル(PZ-)、p-トルエンシルホニル(tosyl-);o-ニトロフェニルスルフェニル(Nps-)など、である。ホルミルも使用できる。

ジペプチドまたはポリペプチドの生成においてアミノ部分を供与するのに適しているアミノ酸類の例には、上記のものは全て包含される。フェニルアラニンが好適であり、そして特にベンジル系炭素のところで置換された誘導体類、例えばベンジル系炭素が例えば接触加水分解または電気化学的還元分解の如き方法により少なくとも1個の

例えばt-ブトキシ(-O-t-Bu);並びに置換されていてもよいベンジルオキシ基、例えばベンジルオキシ(-OBzl)、p-ニトロベンジルオキシ(-OBzl(p-NO₂))、ベンズヒドリルオキシ(-OBzh)、ベンジルアミノ(-NHBzl)、2,4-ジメトキシベンジルアミノ(-NHDMB)、ベンズヒドリルアミノ(-NHBzh)または置換されていないアミノ(-NH₂)などが包含される。また、アミドおよびヒドラジド基をC-末端保護基として使用することもできる。

水-混和性有機溶媒類は本質的に無水の「生の」状態で使用することもまたは水および/または他の有機溶媒類(水-非混和性および水-混和性溶媒類の両者)と組み合わせて使用することもできる点を理解すべきである。水を使用する場合、その量は一般的に全溶媒系(水および水-混和性溶媒)を基にして50%以下にすべきである。しかしながら、ある種の溶媒は金属イオンと錯体形成しそしてそれにより種々のメタロプロテインゼ

酵素を不活性化させるようであり、従ってそのような溶媒類と共に使用される水の量は一般的に溶媒系の50重量%以上でなければならない。錯体形成する溶媒の例には、DMFおよびDMSOが含まれる。溶媒が乾燥状態すなわち生の状態である場合、それは酵素を固定するために使用される基質により吸収されている幾分かの水(例えば溶媒の約10重量%まで)を含有しているであろう。好適なアセトニトリル溶媒に関して言えば一般的に水の量は最少値に保たれており、そして「生の」アセトニトリルが良好な溶媒であることが見いだされており、その場合、供給される水は基質から生じるものだけである。しかしながら、連続的に実施する時には、アセトニトリル溶媒中の水の量は少なくとも10重量%の水準に保たなければならない、そして一般的には5~50重量%の範囲内となるであろう。酵素の変性を避けるにはこの水量が推奨され、そして基質の溶解も助けるであろう。該方法を連続的に実施する場合には、希望により、水を基質流を介して加えることもできる。

リオリシン」と称されてきており、そしてここでもその名前で呼ぶことにする。V.プロテオリチクスの他の菌株もATCCまたは個人的な生産源から入手できるが、希望する酵素を製造しないかもしれない。V.プロテオリチクス ATCC 53559菌株は、メリーランド州 20852、ロックヴィル、パークローン・ドライブ、12301のアメリカン・タイプ・カルチャー・コレクションに保管されている。培養物は利用に関しては何の制限なしに保管されており、そして本件の譲渡人であるW.R.グレース・アンド・カンパニーはこの培養物をATCCを通じて現在出願している特許の認可の下で公的に永久に利用できることが保証されている。酵素は精製された形で用いる必要はなく、ビブリオリシン酵素を含有しておりそして1種以上の他の酵素も含んでいるかもしれない多少粗製状態の調合物(例えば濃縮され部分的に精製された発酵肉汁)であってもよい。

公知の如く、多くのプロテアーゼ酵素はエステラーゼ活性も示す。この活性は場合によっては水

特にN-保護されたアスパルチン酸とフェニアラニン低級アルキルエステル類およびそれらのベンジル置換された誘導体類との結合(パッチ式または連続的方法)においては、アセトニトリルを種々の量の水と共に加えることができるが、水の量が50重量%以下であることが好ましく、すなわちCH₃CN/H₂O比は1以上、好適には約2.5以上、でなければならない。

当技術の専門家に公知の方法を使用して、多数の要素、例えば基質およびジペプチドまたはポリペプチド生成物の溶媒中での溶解性、水または他の共溶媒の存在量、共溶媒の酵素に対する影響および他の要素、を考慮にいと、それぞれの結合反応用の有機溶媒を最適に選択することができる。

メタロプロテアーゼ類がペプチド結合生成に関与することは知られている。本発明では、ビブリオ・プロテオリチクス (*Vibrio proteolyticus*) ATCC 53559を上記の水-混和性有機溶媒系と共に使用する。このプロテアーゼは「ビブ

一混和性有機溶媒の適当な選択により減少させることができる。例えば、アセトニトリルはエステラーゼ活性を減少させる際にある程度の効果を示す。また、エステラーゼ活性が別の蛋白質により起因するような場合、または両者の位置が同じ分子上にあると仮定してエステラーゼ活性の位置がプロテアーゼ位置とは異なっている場合、さらにエステラーゼ活性を減少させるために抑制剤を使用することもできる。適当な抑制剤はカラスムギ、ファバ、インゲンマメおよびトマトから抽出できる。抽出方法は、日本農芸化学会誌、31、38頁(1957)中に開示されている。抑制剤は純粋物質である必要はなく、粗製抽出物であってもよい。

また、ビブリオリシン調合物中に存在しているエステラーゼ活性を、pHを高めた条件下で酵素を製造することにより減少させることもできる。ビブリオ・プロテオリチクス ATCC 53559を、約8.0~約8.6の、好適には約8.4~約8.6の、pHにおいて培養することにより、

エステラーゼ不純物をほとんどまたは全く含有していないビブリオリシン酵素を入手できる。高められたpHにおける製造は、ここでは望ましくないエステラーゼ活性の製造減少および望ましいプロテアーゼ(ビブリオリシン)活性の製造増加の両方をもたらすことを示している。エステラーゼ活性が減少するにつれて、ビブリオリシンは上記の如く粗製形でまたは精製形で利用できる。

プロテアーゼ酵素は本発明では結合された形または遊離形で使用できる。「結合された」という語は、酵素が適当な不溶性担体上に固定されて回収および再使用可能な錯体を形成することを意味する。適当な固定方法には、物理的吸着、イオン結合、共有結合、架橋結合およびその後の吸着、または本質的に反応媒体中に不溶性である担持物質中でのもしくは該物質上での酵素の別の包囲方法などが包含される。適当な基質には、ケイ素系物質(例えば多孔性シリカ)、非-ケイ素系セラミックス(例えばアルミナ)、または天然もしくは合成有機重合体物質(例えばアンペルライト

ニン低級アルキルエステル結合反応に関しては、両方の基質がL配置である時には酸/エステルモル比は1:1のモル比であり得る。実際には、それらは10:1~1:10の間の、好適には3:1~1:5の間の、範囲にわたる比で使用できる。原料がDL配置である場合には、それらは上記の如きL-異性体類の比を生じるような量で利用できる。

本発明は例えば、水を含有している固定された酵素を両出発原料も含んでいる水と混和性である有機溶媒中に懸濁させ、そして次に攪拌しながら反応を進行させることにより、実施できる。反応の完了時に、生成物を含有している媒体を濾過または他の分離方法にかけることにより、固定された酵素および反応生成物を含有している懸濁液または溶液を分離できる。

本発明はまた、水を含有している固定された酵素を充填してあるカラム中に2種の出発原料を含有している水-混和性有機溶媒を流すことによっても、実施できる。この方法では反応を連続的に

XAD-7、ポリアクリルアミド共重合体、アガロース、およびアルギネート)が包含される。

それとは対照的に、「遊離」酵素は結合されておらず、そしてそれは溶媒系中に溶解または懸濁させることができる。アセトニトリル中では、酵素を最初に結合させたり上記の如く基質上に固定させたりせずに、懸濁した固体沈殿状態で使用できる。固体酵素は、アセトニトリルの存在下で実施例IIIに記されているようにして沈殿させることにより、製造される。

高濃度の基質アミノ酸類を準備して反応を納得のいく反応速度で実施することが好ましい。結合反応用には、各基質は水中でのその溶解度内の濃度で使用される。しかしながら、反応が進行するにつれて原料が消費されるため、懸濁状態の基質部分を有することもある。溶液中では基質原料はそれぞれ約0.001M~約2Mの範囲内の、好適には約0.1M~約1Mの間の、濃度において存在すべきである。

N-置換されたアスパルチン酸/フェニルアラ

実施でき、そしてこれは本発明の工業的用途には有利である。

反応温度は普通約10~約35℃の間の、好適には約20~約25℃の間の、範囲である。

反応時間は、2種の基質の濃度、固定された酵素の量、予め決められた転化速度などに依存している。しかしながら、普通は約0.5~約200時間の、好適には約2~約24時間の、反応時間で充分である。

希望する生成物がアスパルターメとして知られているジベプチドである場合には、反応生成物すなわちN-置換されたアスパルチン-L-フェニルアラニンメチルエステルを例えば反応混合物の濃縮およびその後の結晶化、抽出などの如き一般的な手段により単離できる。反応混合物は固定された酵素から、当技術で公知の適当な方法により分離できる。分離後に、固定された酵素を再使用できる。

本発明を実施する際には、アミノ酸基質はDL配置またはL配置であってよい。酵素がL異性体

に固有でありしかもD,L異性体を使用する場合には、L異性体だけが反応中に沈殿し、一方D異性体は未反応のまま反応媒体中に残存している。酵素が立体固有性を有していない場合には、D異性体も使用でき、例えばD,L固有性を有していないセリンの加基酵素を用いるならアミノ供与体（例えばアラニンまたはフェニルアラニン）はDであってもよい。

実施例I. ビブリオ・プロテオリテクス ATC

C 53559の発酵によるビブリオリシンの製造

1. 培養物の製造

A. 製造 100mlの種媒体を500mlの目盛り付きエルレンマイヤー・フラスコ中に加え、そして121℃のオートクレーブ中に20分間入れた。

B. 接種 -70℃の1個の微生物のアンブルを水道水の下で溶解し、次に種フラスコに無菌的に移した。

C. 培養 接種フラスコを258rpm/27

c. RPM=1000。

d. 溶解された酸素は1.0-LPM
空気において100%と読む。

(2) 10mlの種肉汁を用いて接種。

C. 操作

(1) 上記の条件を保つ。

(2) 溶解された酸素はピーク需要量で約75-80%に低下するであろう。

(3) 下記の事項を監視する：

a. 光学的密度-640nm吸収値で読みとる。約12-14時間で約10-12 O.D.におけるピーク。

b. メタロエンドペプチダーゼの製造
-約0.1単位/秒。

3. ビブリオリシンの収獲および濃度

約10-14時間の発酵時に、生成物酵素はFAGLA試験により測定された約0.10-0.20g/リットルの滴定値に達した。細胞が発酵段階（約10-25%）となるまで溶解する前に肉

汁において18時間培養した。

D. 640nm. において測定された成長度は4.0-6.0の間の光学濃度であり、肉汁のpHは約8.0であった。

2. 大規模発酵 1.5リットルの発酵器中で、
1.0リットル容量

A. 製造 全ての媒体成分（ポリペプトン-40g、海塩-20g、MgSO₄·7H₂O-0.4g、P-2000-0.2ml）を容器にかえ、そして殺菌するまではpHは調節しなかった。それはpH7.0近くであるはずである。オートクレーブ中で殺菌する場合には、1.0リットル容器を121℃の温度において45分間殺菌すべきである。

B. 接種

(1) 第一セットおよび二重検査操作条件：

a. 6N NaOHを用いてpHを8.6にする。

b. 温度=27℃。

汁を収獲した。

最初に、肉汁全体を遠心して細胞部分を分離した。次に上澄み液を、アミコンSIOYIOまたはSIIYIO限外濾過カートリッジを使用して、70-100倍に濃縮した。

ビブリオリシン酵素はしばしば1種以上のアミノペプチダーゼを不純物として含んでいる。アミノペプチダーゼ活性（下記で定義されている）が約0.7単位/秒以下に低下するまでビブリオリシン濃縮物を周囲温度（例えば25℃）で約11.5のpHにおいて約6時間保つことにより、これらの酵素の望ましくないエステラーゼ活性を減じることができた。最後に、処理されたエステラーゼを含んでいないビブリオリシン濃縮物をその伝導性の読みが1.0mS以下になるまで脱イオン水で洗浄した。アミノペプチダーゼ活性は下記の工程により試験できた：

アミノペプチダーゼ

アミノペプチダーゼ（エステラーゼ）活性は、L-ロイシン-p-ニトロアニリド（ミズーリ州、

セントルイスのシグマ・ケミカル・カンパニー)の放出による0.5 nmにおける吸収率の増加を監視することにより、測定できた【プレスコット(Prescott), J. M. 他、バイオケミストリ(Biochemistry)、24:5350-5356(1985)】。該試験は、0.7 mlの0.001 Mロイシン-p-ニトロアニリド、50 mMトリス-HCl (pH 7.04) および適当量の酵素を使用して、実施された。活性単位は下記の如く定義されている:

アミノペプチダーゼ単位/ml

$$\frac{\Delta \text{絶対}/\text{分} \times (\text{クヴェット容量} + \text{試料容量}) \times 10}{9.66 \times (\text{試料容量})}$$

ここで容量はマイクロリットルで測定され、そして9.66はL-ロイシン-p-ニトロアニリドに関するマイクロモル吸光係数である。

ビブリオリシン活性

ビブリオリシン活性の測定用に、アゾカゼイン(ミズーリ州、セントルイスのシグマ・ケミカル・

【N-ホルホルノ】エタンスルホン酸)中に再懸濁させた。アンペライトXAD-7を真空濾過することにより過剰の水を除去した後に、ビーズ(100 g)を9.0 gのビブリオリシンを含有している4 mlの100 mlの0.05 M MES-0.02 M CaCl₂緩衝液中に懸濁させた。一夜振盪した後に、固定されたビブリオリシンをMES-CaCl₂緩衝液で充分洗浄し、そして次に真空濾過した。

N-ホルミルアスパルチン酸(1.93 g)およびL-フェニルアラニンメチルエステル(6.2 g)をアセトニトリル中に溶解させて、150 mlの最終的な量とした。14.5 gの固着している固定された中性プロテアーゼを添加した後に、室温で24時間反応させた。最終生成物濃度(N-ホルミルアスパルチン酸-L-フェニルアラニンメチルエステル)をHPLCにより測定すると、11.7 g/lであった。溶媒を真空中で蒸発させ、残渣を酢酸エチル中に溶解させ、そして1 N HClで2回洗浄した。水相を酢酸塩で処

カンパニー)を基質として使用できた。ビブリオリシンを、1.0 mg/mlのアゾカゼインを含有している50 mMトリス-HCl緩衝液(pH 7.4)と共に培養した。37℃における10分間の培養後に、0.5ミリリットルの10重量/容量%のトリクロロ酢酸を加え、直後に混合し、そして混合物を氷の上で10分間保った。混合物を次に遠心し、そして生成した上澄み液の光学濃度を420 nmにおいて、緩衝されたアゾカゼイン溶液中に酵素または不活性化された酵素を含有していない対照用と対比して測定した。

実施例II. N-ホルミルアスパルチン酸の結合

実施例Iに記されている如くして製造されたビブリオ・プロテオリチクスからの発酵肉汁を濃縮し、そして洗浄した。発酵肉汁中の中性プロテアーゼをアンペライトXAD-7上で下記の工程により固定した: アンペライトXAD-7樹脂ビーズをエタノールおよび次に水で洗浄して、微細物を除去した。洗浄されたビーズを0.05 M MES-0.02 M CaCl₂溶液(MESは2

理した。一緒にした有機相を食塩水で洗浄し、そして無水MgSO₄上で乾燥した。溶媒を蒸発させると無色の固体が得られ、それをジクロロエタンから結晶化させた。それはN-ホルミルアスパルターメであると同定された。

実施例III-懸濁させた固体酵素

実施例Iで製造されたビブリオリシンの静かに攪拌されている溶液(5.0 ml, 10-11 mgの蛋白質/ml)に、アセトニトリル(45 ml)を0℃において滴々添加した。生成した沈澱を遠心により集めた。この粗製酵素混合物を80 mMのホルミルアスパルチン酸および240 mMのL-フェニルアラニンメチルエステルの95%アセトニトリル溶液に加えた。反応混合物を5時間攪拌した。HPLC分析結果は、混合物が65 mMのホルミルアスパルターメを含有していることを示した。

本発明の主なる特徴および態様は以下のとおりである。

1. アミノ酸もしくはN-末端保護基を有するペ

プチドまたはそれらの塩の酸成分を、ペプチド結合の生成に介在するビプリオリシンの存在下で、アミノ酸もしくはN-末端保護基を有するペプチドまたはそれらの塩のアミン成分と反応させることによる、ジペプチドまたはポリペプチドの製造方法。

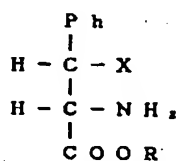
2. 反応を水-混和性溶媒の存在下で実施する、上記1に記載の方法。

3. 溶媒がアセトニトリルである、上記1に記載の方法。

4. 溶媒の少なくとも50重量%がアセトニトリルでありそして残りが水である、上記2に記載の方法。

5. 溶媒の少なくとも50重量%がアセトニトリルでありそして残りが水、1種以上の水-混和性有機溶媒またはそれらの混合物である、上記2に記載の方法。

6. 水-混和性溶媒が1価または多価アルコール、ニトリル、エーテルまたはそれらの混合物である、上記2に記載の方法。



〔式中、

Phはフェニルであり、

Xは-OH、-SH、-Cl、-Br、-I、
-PCOCH₃、-OCOCH₃、-NH₂

またはSCH₃であり、そして

Rは炭素数が1~4のアルキル基である〕

に相当する、上記1に記載の方法。

14. Xが-OHであり、そしてRがメチルである、上記13に記載の方法。

15. ビプリオリシンをビプリオ・プロテオリチクス ATCC 53559の培養物から製造する、上記1に記載の方法。

16. pHが約8.0~約8.6の間である条件下でビプリオリシンを製造する、上記15に記載の方法。

17. 該pHが約8.4~約8.6の間である、上

7. アミノ酸成分がN-置換されたアスパルチン酸またはその塩およびベンジル炭素原子が水素または1種以上の水素で容易に置換可能な不安定な基で置換されているフェニルアラニン低級エステルである、上記1に記載の方法。

8. N-保護基がホルミルまたはベンジルオキシカルボニルである、上記7に記載の方法。

9. フェニルアラニンベンジル炭素がヒドロキシルで置換されている、上記7に記載の方法。

10. エステルの低級アルキル置換基がメチルである、上記7に記載の方法。

11. 方法をエステラーゼ抑制剤の存在下で実施する、上記1に記載の方法。

12. N-保護基がターシャリーアルコキシカルボニル、ベンジルオキシカルボニル、p-トルエンスルホニル、o-ニトロフェニルスルホニルまたはホルミルである、上記7に記載の方法。

13. フェニルアラニン低級アルキルエステルが式

記16に記載の方法。

18. 反応温度が約10~約35℃の間である、上記1に記載の方法。

19. ビプリオリシンを懸濁された固体沈澱状で使用する、上記3に記載の方法。

特許出願人

ダブリュー・アール・グレイス・アンド・カンパニー-コネチカット

代理人

弁理士 小田島 平 吉



第1頁の続き

②発 明 者

ドナルド・ゼイン・フ
オートネイ

アメリカ合衆国メリーランド州21207ボルチモア・クレイ
リッジロード 1555